琉球大学学術リポジトリ

シロアリのセルラーゼ活性について(農芸化学科)

メタデータ	言語:
	出版者: 琉球大学農学部
	公開日: 2008-02-14
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 当山, 清善, Toyama, Seizen
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4525

シロアリのセルラーゼ活性について

当　山　清　善*

Seizen TOYAMA: On the termite cellulase activity.

I 緒　言

セルラーゼは植物細胞壁の主な構成成分であるセルロースを加水分解する酵素で，その存在が知られている起源は極めて多い。すなわち高等植物をはじめとして糸状菌や細菌においてその存在が知られている[6]。一方動物界においてもセルラーゼの存在が古くから知られ，環形動物，節足動物，軟体動物などの無脊椎動物のほとんどの種類にセルラーゼ活性の認められることが最近明らかになった[13]。

近年，微生物起源のセルラーゼの食品加工への応用の一環として研究が盛んに行なわれると共に[2.11]，セルラーゼの作用機作についての多くの知見が得られつつある[1.8.9]。しかし，動物起源セルラーゼについてのこれまでの研究は比較的少なく最近にいたって，微生物起源のそれとの比較検討がなされ始めている現状である[10]。

筆者[12]らは糸状菌セルラーゼによる甘蔗バガス（砂糖きび絞り粕）の分解についての研究を行なっており，動物起源のセルラーゼとの関連においても検討を進めている。本報においてはイエシロアリから抽出した粗酵素液のセルラーゼ活性について，2，3の性質を検討すると共にバガスに対する作用を調べたので報告する。

II 実 験 方 法

粗酵素液の調製： 粗酵素液はイエシロアリ約1000匹を5gの海砂と共に磨砕して生理的溶液（NaCl 0.75%，KCl. 035%，$CaCl_2$ 0.021%，$NaHCO_3$ 0.02%）25*ml*を加え，室温で30分間抽出した後遠沈（10,000 *r.p.m.*）した上澄液である。この粗酵素液でセルラーゼ活性の存在することが確認されたのでこれをアセトン分別した。すなわちアセトン0～20%で沈でんする部分には酵素活性が低く，20～60%で沈でんする部分にたかい活性が認められた。従って本実験で使用した酵素液は抽出粗酵素液からアセトン20～60%で沈でんする部分を上記生理的溶液（pH 6.8）に溶解したものである。

酵素反応および酵素活性の測定： 酵素反応液の組成は，酵素液0.5*ml*，1%カルボキシメチルセルロース（CMC）1.0*ml*，酢酸塩緩衝液（pH4.5）2.5*ml*および蒸留水1.0*ml*で，反応は40°C，60分間行なった。酵素活性の測定は Somogyi の改良法[7]により還元糖を定量した。即ち上記反応混液1.0*ml*に Somogyi 混液1.0*ml*を加えて反応を停止し，常法通り発色させて日立分光光度計（UV136）で吸光度（OD 520）を測定した後検量線からグルコース量を求めた。酵素活性の表示は酵素液添加直後のグルコースの値を酵素反応後の値から差引き反応液1.0*ml*当りのグルコース*mg*数で示した。バガスを酵素液の基質とする場合およびメイセラーゼを酵素液とする場合の反応は前報[12]の通りで同様に反応後の還元糖量を求めた。

* 琉球大学農学部農芸化学科

III 実験結果および考察

1 カルボキシメチルセルロース (CMC) の分解について

セルロース物質の酵素による分解は多くの種類の酵素作用によって行なわれており[8]，従って酵素活性を測定する場合には基質の選択を十分吟味する必要があるとされている。すなわち酵素反応の基質としては天然セルロースあるいはそれに近い沪紙や脱脂綿などの不溶性のものと，可溶性のCMCを用いる場合とがある[4]。本実験においては基質としてCMCを用い還元糖の生成量を測定することにより酵素活性を求めた。Fig. 1 はシロアリから得たアセトン分別酵素液の CMC に対する作用を示したものである。図から明らかのように CMC は分解されて還元糖が時間と共に増加する。しかし反応時間60分頃からは還元糖の増加が減少してくる。この現象は微生物起源の酵素でもみられ CMC の置換基の阻害作用のためであるといわれている[9]。

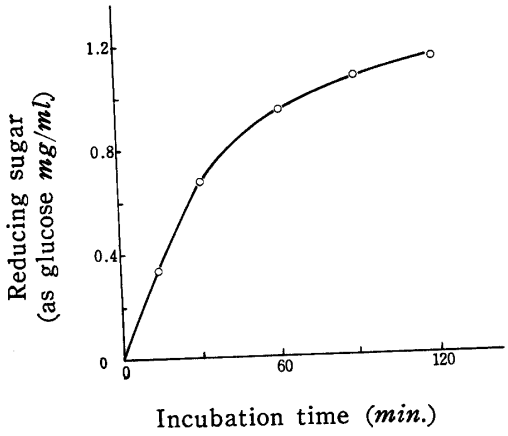

Fig. 1. Decompostion of CMC by the termite cellulase preparation.
Incubation mixture; Enzyme solution 0.25 *ml*, 1% CMC 2 *ml*, pH 5 acetate buffer 2 75 *ml*. Incubation was carried out at 40°C.

2 酵素活性に及ぼす酵素液濃度およびCMC濃度の影響

基質の CMC 濃度を一定にして酵素液濃度を種々変えて反応を行ない還元糖の増加をみたのが Fig.2 である。酵素液がうすい場合には還元糖の増加は直線的であるが，濃度がたかくなると減少してくる。Fig.3. は酵素液の量を一定にして基質CMCの濃度を変えた場合の還元糖の増加を示したものである。図から明らかのようにCMC濃度と還元糖の増加は直線的関係にある。

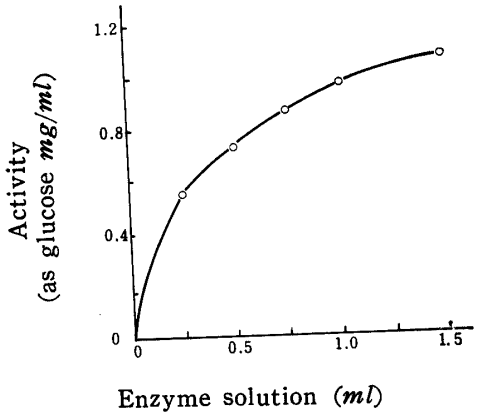

Fig. 2. Effect of enzyme concentration on the termite celluase activity.
Reaction mixtune: Enzyme solution 0.25～1.5 *ml*, 1% CMC 2*ml*, pH 5 acetate buffer 1.5ml in 5ml. Incubation was done at 40°C for 60 *min*.

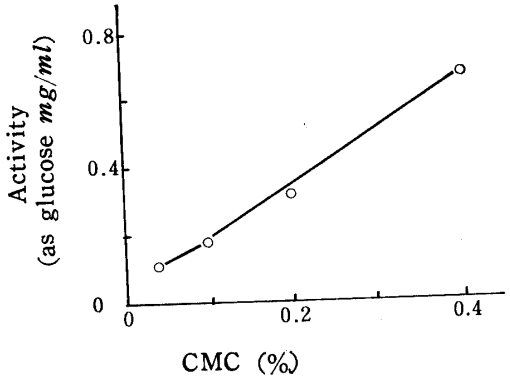

Fig. 3. Effect of CMC concentration on the termite cellulase activity.
Reaction mixture: Same as in Fig.1.

3 酵素活性に及ぼす反応pHおよび温度の影響

CMCを基質として反応液のpHを種々変えた場合の還元糖の増加を調べたのがFig.4.である。図から明らかのように，反応最適pHは4.5～5.0付近にあり，pH3.0以下では全く還元糖の増加がみられない。微生物起源の酵素のCMCに対する作用最適pHは微生物の種類により異なるがほとんどの酵素はpH4.5～5.5付近にある[1]。

Fig.5.はCMCを基質として反応液の温度を変えた場合の還元糖の増加をみたものである。反応最適温度は45°C付近にあり，50°Cにおいても還元糖の増加がみられ本酵素が熱に比較的安定であることを示している。本酵素のpHおよび熱に対する諸特性を知るためにはpH安定性や熱安定性を更に検討する必要がある。

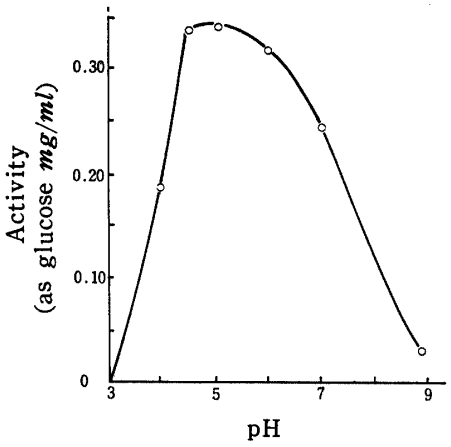

Fig. 4. Effect of pH on the termite cellulase activity.
Reaction mixture: Enzyme solution 0.5 *ml*, 1% CMC 1.0 *ml*, buffer solution 3.5 *ml*
Buffer solutions: pH 3 sodium acetate-HCl, pH 4-5 sodium acetate-acetic acid, pH 6-7 citric acid-Na_2HPO_4, pH 9 Tris-HCl.

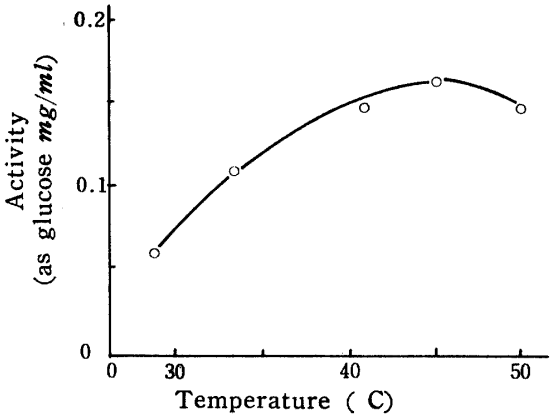

Fig. 5. Effect of temperatur on the termite cellulase activity
Reaction mixture: same as in Fig.4.

4 バガスの分解について

筆者ら[12]は甘蔗バガスの微生物による分解について種々実験を行った結果，アルカリ処理を行なったバガスは糸状菌セルラーゼによって分解され還元糖の生成が著しくたかめられることを明らかにした。現在バガス分解力の強い微生物の検索を行ないつつあるが，本実験ではシロアリ起源のセルラーゼがバガスを分解して還元糖の増加があるかどうかを検討した。Fig.6.は熱水処理およびアルカリ処理をしたバガスに対する酵素作用を示したものである。図から明らかのように，糸状菌から得たセルラーゼの場合と同じく熱水処理バガスからの還元糖の増加は僅かで，アルカリ処理バガスにおいて還元糖の増加が著しくたかい。Fig.7.は前報[12]と同様に市販セルラーゼ粉末（メイセラーゼ）を酵素液として，またこれにシロアリから得た酵素液を加えた場合のアルカリ処理バガスに対する作用を調べたものである。図からわかるように，メイセラーゼにシロアリ起源のセルラーゼを加えても還元糖の増大はほとんど変らない。

Fig.5.およびFig.6.の結果から天然セルロース物質に近い化学組成を有する熱水処理バガスはシ

ロアリ起源のセルラーゼによっても分解され得ないことを示し，またシロアリセルラーゼはメイセラーゼ作用に対する相補効果もみられないことを示している。本実験結果だけからは微生物起源のセルラーゼ作用とシロアリセルラーゼの作用が同じであるとはいえないが，バガスに対する作用は両起源の酵素共ほとんど同じであると考えられる。微生物のセルラーゼはその給源によりそれぞれ特異性や作用機作が異なっているものと考えられている[9]。しかしシロアリセルラーゼについての酵素化学レベルでの知見は比較的少なく今後の研究に待たなければならない。また本実験においてはシロアリを直接磨砕して得た抽出液を酵素給源としているので，本酵素がシロアリ自身のセルラーゼであるのか，あるいはシロアリに共生している原生動物のそれであるのか明らかでない[3.5.13]。

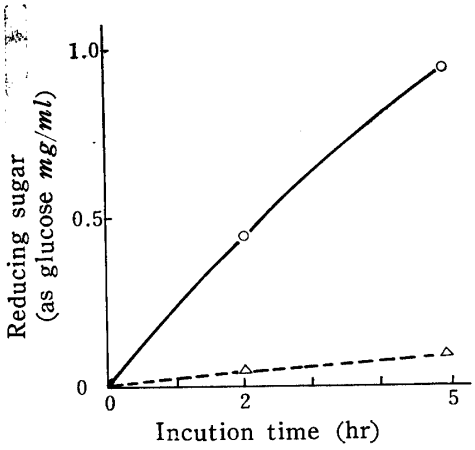

Fig. 6. Decomposition of sugarcane bagasse by termite cellulase.
Reaction mixture: Enzyme solution 2 *ml*, bagasse 50 *mg*, pH 5 acetate buffer 2 *ml* in 5 *ml*.
—○— 1% NaOH treated bagasse
…△… Heat water treated bagasse

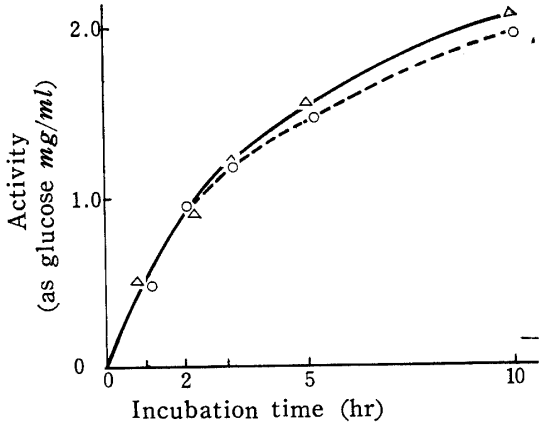

Fig. 7. Effect of termite cellulase preparation on the Meicelase activity
Reaction mixture: Meicelase (10 *mg*/*ml*) or termite cellulase solution 0.5 *ml*, 1% NaOH treated bagasse 50 *mg* ph 5 acetate buffer 5 *ml* in 10 *ml*.
△—△ Meicelase +termite cellulase
○…○ Meicelase

Ⅳ 要　　約

イエシロアリのアセトン分別酵素液を用いカルボキシメチルセルロース（CMC）および甘蔗バガス（砂糖きび絞り粕）に対する作用を調べ以下のような結果が得られた。

1　CMCはシロアリセルラーゼで分解され還元糖の増加があった。反応液の酵素液濃度およびCMC濃度の増大にともない還元糖の増加がみられた。

2　シロアリセルラーゼのCMCに対する反応最適pHは4.5-3.5にあり，反応最適温度は45°Cであった。

3　シロアリセルラーゼはアルカリ処理バガスを分解して還元糖を生成するが，熱水処理バガスはほとんど分解しなかった。

最後に供試シロアリを提供して下さった琉大林学科屋我嗣良助教授に感謝します。本実験を進めるにあたって御教示下さった琉大生物学科池原貞雄教授，また種々御便宜を図って下さった農化　鎮西忠茂教授，宮里興信助教授に感謝致します。

文　　献

1)　石井茂孝・菊地忠昭・横塚　保　1969　植物組織の酵素的分解に関する研究，農化 43：536—543

2) 黒田彰夫 **1966** セルラーゼと関連酵素の利用について，食品工業(16) **9**：37～44
3) 近藤民雄 **1964** 木材の抗シロアリ成分，化学と生物 **2**：80
4) 松葉豊・小巻利章 **1964** CMCを基質とするセルラーゼの1力価測定法，食品工業 **5**(16)：**22**
5) 森本桂 **1967** シロアリ研究の現状，生物科学 **18**：106
6) 西沢一俊 **1956** 酵素研究法 **2**：137 朝倉書店
7) 二国二郎 **1955** 澱粉科学 684 朝倉書店
8) 西沢一俊 **1962** Cellulose の酵素的分解機序 醗工 **40**：150～160
9) 丹羽富造・西沢一俊 **1965** Cellulase 研究の最近の動向，醗協誌 **23**：485
10) 岡田厳太郎・西沢俊樹・西沢一俊 **1966** 動物起源セルラーゼに関する研究 醗工 **44**：198～20
11) 外山信男 **1962** セルレースの生産と応用，食品工業 **5**(16)：1～16
12) 当山清善・保井美恵子 **1969** 甘蔗バガスの微生物による分解について 琉大農学報 **16**：147
13) 横江靖郎 **1966** 無脊椎動物の cellualase 醗工 **44**：858～867

Summary

These experiments were carried out to investigate the decomposition of carboxymethylcellulose (CMC) and sugarcane bagasse by the termite cellulase preparation which was extracted from termites (*Coptotermes formosanus*), and then fractionated with aceton. The results obtained were as follows:

1) CMC was decoposed by the termite cellulase preparation, increasing in the reducing sugar. With increasing concentration of the enzyme solution and CMC of the enzyme reaction mixture, the amount of the reducing sugar increased.
2) The optimal pH of the termite cellulase activity for the decomposition of CMC as substrate was in a range of pH from 4.5 to 5.5, and the optimal temperature was 45°C.
3) Alkali treated bagasse was decomposed by the enzyme preparation, increasing in the reducing sugar. However, heat water treated bagasse was hardly decomposed.